

09/720363
528 Rec'd PCT/PTO 22 DEC 2000

DOCKET NO. MUR-025-USA-PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:
H. ARIMA, et al.

Serial No.: Corresponding to PCT/JP99/03315
filed June 22, 1999

Filed: Concurrently herewith

For: Antisense Oligonucleotide Inhibiting IL-10 Protein
Expression

CLAIM FOR PRIORITY

Honorable Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign application filed in Japan is hereby requested for the above identified application and the priority provided in 35 U.S.C. 365 is hereby claimed:

Japanese patent application No. 10-177188 filed June 24, 1998

In support of this claim, a certified copy of said original foreign application was filed with the International Bureau on June 22, 1999 as evidenced by form PCT/IB/304, which is attached.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. 365 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of these documents.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DOCKET NO. MUR-025-USA-PCT

Respectfully submitted,

TOWNSEND & BANTA

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Donald E. Townsend', with a long, sweeping flourish extending to the right.

Donald E. Townsend
Reg. No. 22,069

TOWNSEND & BANTA
1225 Eye Street, N.W.
Suite 500
Washington, D.C. 20005
(202) 682-4727

Date: December 22, 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/720363

PCT/JP99/03315

日 本 国 特 許 庁 EV

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

22.06.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 6月24日

REC'D 06 AUG 1999

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第177188号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

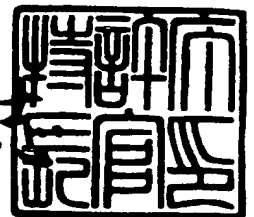
久光製薬株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 7月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建



出証番号 出証特平11-3048182

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 HM980004

【提出日】 平成10年 6月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 48/00

【発明の名称】 IL-10 蛋白の発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 東京都八王子市越野 6-12-102

【氏名】 有馬 英俊

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市東豊田 1-29-12

【氏名】 土屋 晴嗣

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1丁目 25番 11号 久光製薬株式会社 筑波研究所内

【氏名】 平田 隆洋

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1丁目 25番 11号 久光製薬株式会社 筑波研究所内

【氏名】 秋山 勝彦

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1丁目 25番 11号 久光製薬株式会社 筑波研究所内

【氏名】 後藤 武

【特許出願人】

【識別番号】 000160522

【氏名又は名称】 久光製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100098110

【弁理士】

【氏名又は名称】 村山 みどり

【代理人】

【識別番号】 100090583

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 清

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051035

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 IL-10 蛋白の発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒトインターロイキン-10 (IL-10) 蛋白をコードする染色体 DNA および／または mRNA と特異的にハイブリダイズし、IL-10 蛋白の発現を阻害する、下記 (A) ～ (G) のいずれか 1 以上の配列を含むことを特徴とするアンチセンスオリゴヌクレオチド。

- (A) 配列番号 1 に記載の配列
- (B) 配列番号 2 に記載の配列
- (C) 配列番号 3 に記載の配列
- (D) 配列番号 4 に記載の配列
- (E) 配列番号 5 に記載の配列
- (F) 配列番号 6 に記載の配列
- (G) 配列番号 7 に記載の配列

【請求項 2】 請求項 1 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を有効成分として含有するアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、全身性エリテマトーデス、エプスタイン-バーウイルス感染症またはリンパ腫の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、IL-10 (ヒトインターロイキン-10) 蛋白をコードする染色体 DNA および／または mRNA と特異的にハイブリダイズして、IL-10 蛋白の発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドと、それを有効成分として含有するアトピー性皮膚炎等の疾患の治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

アトピー性皮膚炎は、増悪、寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする

疾患である。その罹病率は、全人口の3～10%を占めると考えられている（上田宏：皮膚科MOOKアトピー性皮膚炎、金原出版、12-18、1985）。アトピー性皮膚炎の発症メカニズムは未だ明らかにされていないが、少なくともIgEを介したアレルギー反応のみではなく、皮膚の易刺激性という因子もその病態形成に大きく関与すると言われている。

【0003】

アトピー性皮膚炎の病巣部では、肥満細胞や好酸球の脱顆粒、CD4陽性T細胞を主とした細胞浸潤が認められる。皮膚に侵入したアレルゲンは、肥満細胞上のIgEを架橋し、化学伝達物質やサイトカインを遊離させ、血管透過性の亢進や白血球の遊走を促す。また、アレルゲンは、ランゲルハンス細胞などに捕捉され、T細胞に抗原提示される。活性化されたT細胞は、様々なサイトカインを産生し炎症を助長している（Cooper, K.D., J. Invest. Dermatol., 102, 128, 1994）。

【0004】

アトピー性皮膚炎に対する治療は、ステロイド薬によるものと非ステロイド薬によるものとがあり、ステロイド薬は薬物治療の中心となっている。治療は長期に渡ることが多く、薬物の副作用が大きな問題となっている。ステロイド薬を経口投与した場合、全身性の副作用である副腎機能抑制、骨髄抑制、日和見感染症等に注意する必要がある。また、外用ステロイド薬の副作用としては、毛細血管拡張、ステロイド潮紅、皮膚萎縮等のいわゆるステロイド皮膚や、カンジダ、白癬などの皮膚真菌症、癰（よう）等の化膿性皮膚炎、単純性疱疹等のウイルス性疾患などの皮膚感染症が誘発、増悪することがある。また、投与の漸減もリバウンドに注意して慎重に行う必要がある。このような副作用の問題から、現在の治療法に代わる新しい治療法の開発が強く望まれている。

【0005】

一方、アトピー性皮膚炎の詳細な発症メカニズムが近年の研究により明らかになりつつある。Ohmenらは、アトピー性皮膚炎患者の炎症組織において、サイトカインであるインターロイキン-10（IL-10）蛋白が過剰発現しており、これがアトピー性皮膚炎の発症に関与すること、アトピー性皮膚炎において

は単球、マクロファージ系の細胞よりIL-10蛋白が分泌されていること、及びIL-10蛋白の過剰発現を抑制することができればアトピー性皮膚炎の治療が可能であることを報告している(J.D.Ohmen, et al., J.Immunol., 154, 1956, 1995)。

【0006】

IL-10蛋白は、1989年にFiorentinoらにより、Th2細胞から産生され、Th1細胞からのサイトカイン産生を抑制する因子として同定されたサイトカインであり(Fiorentino D., et al., J.Exp.Med., 170, 2081, 1989)、その後、マウスではTh2細胞、CD5陽性B細胞、マクロファージ、ケラチノサイト、肥満細胞より産生され、ヒトではTh0細胞、Th2細胞、活性化T細胞、単球、マクロファージ、活性化B細胞等、多種の細胞より産生されることが明らかにされた(Ishida H., Jpn. J. Clin. Pathol., 42, 843, 1994)。

【0007】

上記のようにアトピー性皮膚炎の発症メカニズムの解析が進行したことに伴い、これらの解析結果を疾患治療に応用しようとする試みもなされるようになってきた。その内容は、疾患の原因と考えられるIL-10蛋白産生の抑制、あるいはIL-10蛋白の機能を阻害して病状の改善を行おうとするものであり、例えば、抗IL-10蛋白中和抗体での治療の検討がなされている(Ishida H., et al., J.Exp.Med., 179, 305, 1994)。

【0008】

また、WO97/31532には、AIDS関連B細胞リンパ腫や慢性リンパ性白血病の治療を目的としたIL-10アンチセンス技術が開示されているが、ヒトのIL-10蛋白のmRNA配列の内、315-342に対するアンチセンスが、上記患者のB細胞から過剰に産生されるIL-10蛋白のオートクライン作用に対して抑制効果があることを開示しているのみであり、その他の配列に対しては全く記載されていない。

【0009】

以上のような状況の下、アトピー性皮膚炎に対し効果があり、しかも副作用が

少ない医薬品が望まれており、特にアトピー性皮膚炎は単球またはマクロファージから過剰に産生されるIL-10蛋白が病因と考えられることから、アトピー性皮膚炎治療に対する新規な抗IL-10製剤の開発が望まれている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の目的は、IL-10蛋白の産生を抑制し、IL-10蛋白を病因とする疾患、例えばアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、全身性エリトマトーデス（SLE）、エプスタインバー（EB）ウイルス感染症、リンパ腫等を治療し得るアンチセンスオリゴヌクレオチドと、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を有効成分として含有する治療薬を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、単球またはマクロファージから産生されるIL-10蛋白が原因となる難治性の疾患に対して有効な治療薬を探索した結果、単球またはマクロファージからのIL-10蛋白の産生を強く抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を発見し、本発明を完成させた。

なお、このアンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、前述のWO97/31532に開示されているmRNA配列の315-342に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとは全く異なる配列である。

【0012】

すなわち、本発明は、ヒトインターロイキン-10（IL-10）蛋白をコードする染色体DNAおよび／またはmRNAと特異的にハイブリダイズし、IL-10蛋白の発現を阻害する、下記（A）～（G）の配列のいずれか1以上を含むことを特徴とするアンチセンスオリゴヌクレオチド

- （A）配列番号1に記載の配列
- （B）配列番号2に記載の配列
- （C）配列番号3に記載の配列
- （D）配列番号4に記載の配列

(E) 配列番号5に記載の配列

(F) 配列番号6に記載の配列

(G) 配列番号7に記載の配列

と、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を有効成分として含有するアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、SLE、EBウイルス感染症またはリンパ腫の治療薬である。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳しく説明する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列表に示す配列番号1～7の配列のうち1または2以上の配列を含むものである。

配列番号1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの176～193の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号2に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの181～198の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号3に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの367～384の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号4に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの637～654の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号5に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの915～932の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号6に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの1246～1263の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの1249～1266の塩基配列に対して相補的な塩基配列である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1～7の塩基配列の1のみを含むものであっても、2以上を組み合わせる含むものであってもよい。

【0014】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、マクロファージにダメージを与

えることがなく、マクロファージが産生するIL-10の発現を効果的に抑制するが、この抑制効果は、本発明の配列番号1から7の中でも、配列番号1、3、4、5及び6が優れており、配列番号3及び4が特に優れている。

【0015】

なお、配列番号1～7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'側および/または3'側の塩基を1個または2個以上短くしたアンチセンスオリゴヌクレオチドであっても、IL-10蛋白の産生を抑制する活性は消失しないが、ヒトIL-10 mRNAに対する特異性を維持し、他の遺伝子に影響を与えないようにするためには、配列番号1～7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを最小単位として使用することが好ましい。

【0016】

また、配列番号1～7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'側および/または3'側の塩基を1個または2個以上長くしたアンチセンスオリゴヌクレオチドであっても、IL-10蛋白の産生を抑制する活性は消失しないが、アンチセンスオリゴヌクレオチドを化学的に合成する際に、ヌクレオチドの鎖長が長くなるほど合成コストが高くなることから、配列番号1～7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの鎖長で使用することが好ましい。

【0017】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成方法としては、特に限定されず、通常のオリゴヌクレオチド合成機を用いたホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法等を用いることができる。

【0018】

また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの安定性や細胞に対する親和性を高めるために、その活性を著しく低下させない範囲で、リン酸エステル基またはリボース部分の水酸基を他の安定な基に置換した誘導体として用いることも可能である。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドの誘導体の具体例としては、リン酸エステル基をチオリン酸エステル基やメチルホスホネート基等で置換したもの、リボース部分の水酸基をメトキシやアリロキシ等のアルコキシ基、アミノ基、またはフッ素原子等で置換したもの等が挙げられるが、これらの中で

も、リン酸エステル基をチオリン酸エステル基に置換したものが IL-10 蛋白産生抑制効果の点から好ましい。

【0019】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA型あるいはRNA型のいずれであっても IL-10 蛋白産生抑制効果が期待できるが、生体に投与した際の安定性がより高いという理由で DNA型の方が好ましい。

【0020】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒト IL-10 蛋白をコードする mRNA に対して相補的且つ特異的な配列を有し、mRNA または DNA の機能、すなわち、蛋白質への翻訳、細胞質内への輸送、またはその総体的生物学的機能に必要な他の活性のうちのいずれかを阻害することが可能である。さらに、ステロイド剤使用の際に見られるような重篤な副作用がなく、安全かつ効果的に治療を行うことが可能である。

【0021】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、単球またはマクロファージの IL-10 の発現を抑制するものであるため、単球やマクロファージの IL-10 蛋白過剰発現が原因の一つと考えられている疾患、例えば、アトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、SLE、EBウイルス感染症、リンパ腫等を有効に治療することができる。

【0022】

発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、単独でも投与可能であるが、薬学的に許容され得る物質と混合し、製剤として投与することも可能である。

例えば、注射剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを水、生理食塩水またはブドウ糖溶液等に溶解させて調製することができ、必要に応じて緩衝剤、保存剤あるいは安定化剤等を含有させてもよい。

【0023】

軟膏剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、油脂性、乳剤性または水溶性基剤に溶解または分散させて調製することができ、必要に応じて安定化剤、pH 調節剤、可塑剤、乳化剤、界面活性剤、可溶化剤、湿潤剤

、保存剤、防腐剤、溶剤または吸収促進剤等を含有させてもよい。

【0024】

クリーム剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、水相中に溶解または分散させ、炭化水素や高級アルコール等の油相成分と乳化することにより調製することができ、必要に応じて安定化剤、pH調節剤、可塑剤、乳化剤、界面活性剤、可溶化剤、湿潤剤、保存剤、防腐剤、溶剤または吸収促進剤等を含有させてもよい。

【0025】

ローション剤またはリニメント剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、溶剤中に溶解または分散させて調製することができ、必要に応じて安定化剤、pH調節剤、乳化剤、懸濁化剤、界面活性剤、可溶化剤、湿潤剤、保存剤、防腐剤または吸収促進剤等を含有させてもよい。

【0026】

さらに、経皮または経粘膜に適用するイオントフォレーシス製剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドをデバイス中の導電性ゲルや薬物貯留槽等に含有させて調製することができ、必要に応じて安定化剤、pH調節剤、界面活性剤、可溶化剤、湿潤剤、保存剤、防腐剤または吸収促進剤等を含有させてもよい。

なお、これらの製剤は、薬理学的に許容できる治療上有用な他の成分を含有するものであってもよい。

【0027】

また、さらに効率的な投与方法を望む場合には、薬学的に許容される担体と組み合わせた形で投与することも可能である。

担体としては、例えば、リポソーム、脂肪乳剤、ミセル、等の脂質を主成分とする担体、ポリリジンやポリオルニチン等のペプチド性担体、ポリエチレンジイミン、ポリ乳酸／グリコール酸共重合体等の合成高分子担体等が挙げられるが、これらの中でも、カチオン性の電荷を有する担体が好ましい。また、細胞への取り込みの促進や標的とする細胞への指向性を高める目的で上記担体を修飾したものも使用可能である。

【0028】

また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を発現させるようにデザインされたプラスミドやウイルスベクターは遺伝子治療用のベクターとして有用である。

【0029】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドと担体との混和物は、経口投与、静脈内投与、経皮的投与、局所投与、腹腔内投与等、投与経路に制限はないが、各疾患に対して有効性がより高い投与方法を選択することが好ましい。例えば、アトピー性皮膚炎に対する治療の際には、経皮的な投与、例えば、イオントフォoresisによる投与、クリーム剤や軟膏等の外用剤としての投与が好ましい。また、SLEに対しては静脈内投与が好ましい。投与量は、各疾患の症状の度合いや投与経路に応じて増減させることが好ましいが、目安として、静脈内投与では体重当たり1mg/kgから1g/kg、好ましくは5mg/kgから500mg/kg、より好ましくは10mg/kgから300mg/kgである。

【0030】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明の理解を助けるためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例において、配列番号9は、ヒトIL-10蛋白のcDNA塩基配列(DNA Data Bank of Japan: DDBJ, Accession No. M57627)を示す。

また、配列番号1~7はヒトIL-10遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖であり、配列番号1は配列番号9の+176~+193に、配列番号2は配列番号9の+181~+198に、配列番号3は配列番号9の+367~+384に、配列番号4は配列番号9の+637~+654に、配列番号5は配列番号9の+915~+932に、配列番号6は配列番号9の+1246~+1263に、配列番号7は配列番号9の+1249~+1266に、それぞれ対応する。

さらに、配列番号8はマウスIL-10蛋白遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖の配列であり、配列番号9の+1370から+1387の中で、6つのミスマッチ配列を持つ陰性対照群である（比較例1）。

また、実施例に用いたアンチセンスオリゴヌクレオチドはいずれもホスホロチオエート型であり、ファルマシアバイオテク社により受託合成したものをを用いた。

【0031】

実施例1

アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成及び精製

配列表の配列番号1～8のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、DNA合成機Oligo Pilot II（ファルマシアバイオテク社製）を用いて合成した。ホスホロチオエート法に基づき合成し、FPLC director system（ファルマシアバイオテク社製）を用い、イオン交換FPLC法に基づき精製した。

【0032】

試験例1（ヒトIL-10蛋白発現抑制効果試験）

（A）培養細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入

配列番号1～8のアンチセンスオリゴヌクレオチドのヒトIL-10蛋白発現抑制効果を、培養細胞系において検討した。

細胞には、ヒト単球マクロファージ系のU937細胞（大日本製薬製）を、37℃、5%CO₂の条件下で、10%牛胎児血清（FCS：三光純薬製）及び抗生物質（100unit/mlのペニシリン（GIBCO社製）と100μg/mlのストレプトマイシン（GIBCO社製））を添加したRPMI-1640培地（株式会社日研生物医学研究所製）（以下、FCS含有培地と言う）中で維持した。このU937細胞を96ウェルプレートに1×10⁵個/ウェルとなるように播種した後、ホルボールミリステートアセテート（PMA：和光純薬製）を10ng/mlとなるように添加し、12時間培養した（分化誘導）。培養終了後、細胞をリン酸緩衝溶液（PBS）で洗浄し、FCS含有培地でさらに48時間培養した後（休薬期間）、細胞をPBSで洗浄し、各アンチセンスオリゴヌ

クレオチドを $20\mu\text{M}$ となるように添加し、4時間培養した。培養終了後、リボ多糖(LPS:和光純薬社製)FCS含有培地溶液(LPS最終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加し、さらに24時間培養を続けた。

【0033】

(B) IL-10蛋白のELISAによる検出

次いで、上記(A)において得られた培養液から採取した培養上清中のヒトIL-10蛋白を、ELISAにより定量した。

$50\mu\text{l}$ の抗IL-10モノクローナル抗体($1\mu\text{g}/\text{ml}$ 0.1M Na_2HPO_4 溶液、 $\text{pH}9$:Pharmingen社製)を、96穴プレート(sumitomoH-type)に添加し、 4°C にて終夜放置した後、 $200\mu\text{l}$ のPBST(0.05% (V/V) Tween-20を含むPBS)で4回洗浄した。非特異的吸着を防ぐために、Blocking buffer(1% BSAを含むPBS)を各wellに $200\mu\text{l}$ ずつ添加し、室温にて30分放置した後、 $200\mu\text{l}$ のPBSTで3回洗浄した。次に、 $100\mu\text{l}$ のBlocking buffer/Tween(0.05% (V/V) Tween-20を含むBlocking buffer)で希釈した上記(A)の培養液から採取した培養上清及びIL-10蛋白スタンダードをwellに添加し、室温にて4時間放置した後、 $200\mu\text{l}$ のPBSTで4回洗浄した。Blocking buffer/Tween溶液により $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したビオチン標識抗IL-10モノクローナル抗体(Pharmingen社製)をwellに $100\mu\text{l}$ 添加し、室温にて1時間放置した後、 $200\mu\text{l}$ のPBSTで6回洗浄した。さらに、Blocking buffer/Tween溶液で $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したアビジン-パーオキシダーゼ(Pharmingen社製)をwellに $100\mu\text{l}$ 添加し、室温にて30分放置した後、 $200\mu\text{l}$ のPBSTで8回洗浄した。 $50\mu\text{l}$ のTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)substrate(GIBCO社製)をwellに添加し、室温にて30分放置した後、反応停止剤として、 $50\mu\text{l}$ の 1M リン酸を添加し、 450nm での吸光度を測定した。結果を図1に示す。

【0034】

図 1 から明らかなように、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号 1～7）の IL-10 蛋白の発現抑制効果は、非添加群や比較例 1 に比べて、非常に大きいことが判明した。なお、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの中では、配列番号 3 > 配列番号 4 > 配列番号 6 > 配列番号 1 > 配列番号 5 > 配列番号 2 > 配列番号 7 の順で、IL-10 蛋白の発現抑制効果が大きいことが判明した。

なお、顕微鏡による観察では細胞毒性は認められなかった。

【0035】

【発明の効果】

以上説明した通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、IL-10 蛋白の発現を有効に抑制することができるため、IL-10 蛋白が原因となる難治性の疾患、例えばアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、SLE、EBウイルス感染症、リンパ腫等に対して有効である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの IL-10 蛋白の発現抑制効果を示すグラフである。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴：配列番号9の+176から+193に対応

配列

AGAAAAGTCTTCACTCTGC

配列番号：2

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴：配列番号9の+181から+198に対応

配列

TTGAAAGAAAGTCTTCAC

配列番号：3

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 配列番号9の+367から+384に対応

配列

GGTCTTCAGGTTCTCCCC

配列番号 : 4

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 配列番号9の+637から+654に対応

配列

CTGGGTCAGCTATCCCAG

配列番号 : 5

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 配列番号9の+915から+932に対応

配列

GCTTGGAATGGAAGCTTC

配列番号 : 6

配列の長さ : 18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴：配列番号9の+1246から+1263に対応

配列

GGCTGGTTAGGAACCTCT

配列番号：7

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴：配列番号9の+1249から+1266に対応

配列

CCAGGCTGGTTAGGAACCT

配列番号：8

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴：マウスIL-10蛋白遺伝子

配列

AGGTCCTGGAGTCCAGCA

配列番号：9

配列の長さ：1601

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

アンチセンス：No

配列の特徴：ヒトIL-10蛋白のcDNA

配列

```

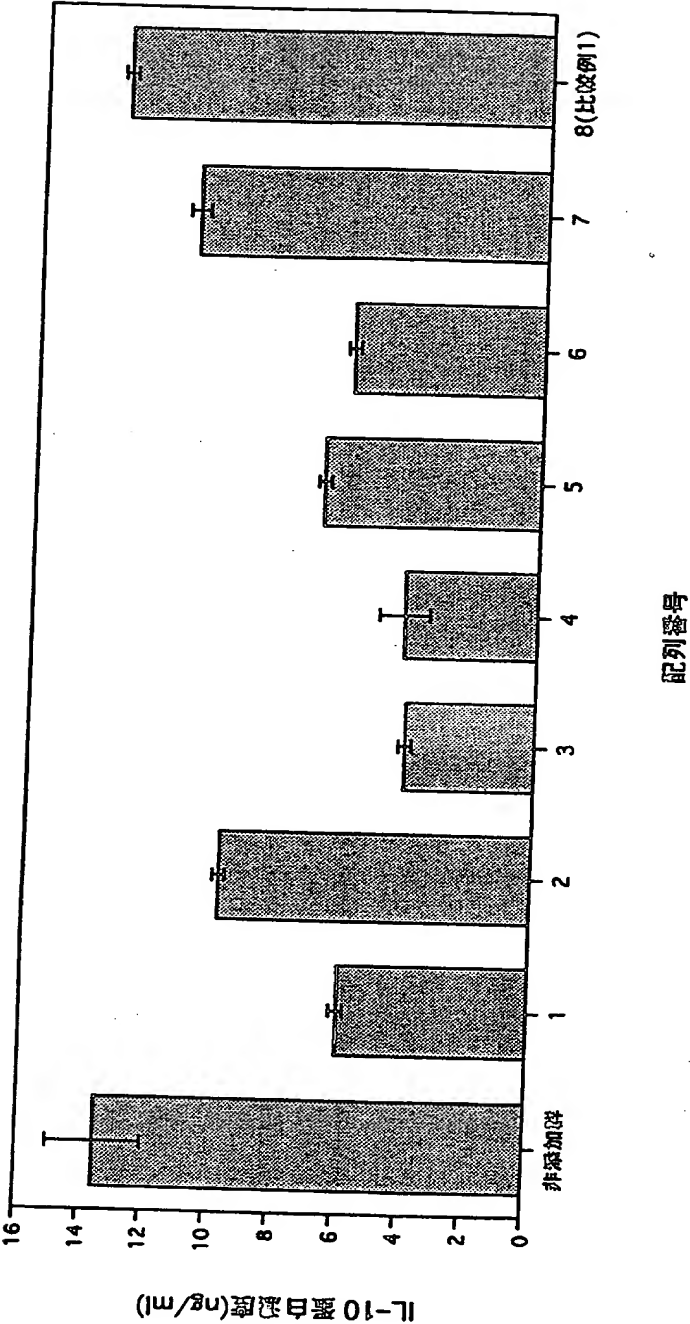
AAACCACAAG ACAGACTTGC AAAAGAAGGC ATGCACAGCT CAGCACTGCT CTGTTGCCTG   60
GTCCTCCTGA CTGGGGTGAG GGCCAGCCCA GGCCAGGGCA CCCAGTCTGA GAACAGCTGC   120
ACCCACTTCC CAGGCAACCT GCCTAACATG CTTGAGATC TCCGAGATGC CTTCAGCAGA   180
GTGAAGACTT TCTTTCAAAT GAAGGATCAG CTGGACAACT TGTGTGTTAA GGAGTCCTTG   240
CTGGAGGACT TTAAGGGTTA CCTGGGTTGC CAAGCCTTGT CTGAGATGAT CCAGTTTAC   300
CTGGAGGAGG TGATGCCCCA AGCTGAGAAC CAAGACCCAG ACATCAAGGC GCATGTGAAC   360
TCCCTGGGGG AGAACCTGAA GACCCTCAGG CTGAGGCTAC GGCGCTGTCA TCGATTTCTT   420
CCCTGTGAAA ACAAGAGCAA GGCCGTGGAG CAGGTGAAGA ATGCCTTTAA TAAGCTCCAA   480
GAGAAAGGCA TCTACAAAGC CATGAGTGAG TTTGACATCT TCATCAACTA CATAGAAGCC   540
TACATGACAA TGAAGATACG AAACGTGAGC ATCAGGGTGG CACTCTATA GACTCTAGGA   600
CATAAATTAG AGGTCTCCAA AATCGGATCT GGGGCTCTGG GATAGCTGAC CCAGCCCCTT   660
GAGAAACCTT ATTGTACCTC TCTTATAGAA TATTATTAC CTCTGATACC TCAACCCCCA   720
TTTCTATTTA TTTACTGAGC TTCTCTGTGA ACGATTTAGA AAGAAGCCCA ATATTATAAT   780
TTTTTTCAAT ATTTATTATT TTCACCTGTT TTTAAGCTGT TTCCATAGGG TGACACACTA   840
TGGTATTTGA GTGTTTTAAG ATAAATTATA AGTTACATAA GGGAGGAAAA AAAATGTTCT   900
TTGGGGAGCC AACAGAAGCT TCCATTCCAA GCCTGACCAC GCTTTCTAGC TGTTGAGCTG   960
TTTTCCCTGA CCTCCCTCTA ATTTATCTTG TCTCTGGGCT TGGGGCTTCC TAACTGCTAC 1020
AAATACTCTT AGGAAGAGAA ACCAGGGAGC CCCTTTGATG ATTAATTCAC CTTCCAGTGT 1080
    
```

CTCGGAGGGA TTCCCCTAAC CTCATTCCCC AACCACTTCA TTCTTGAAAG CTGTGGCCAG 1140
CTTGTTATTT ATAACAACCT AAATTTGGTT CTAGGCCGGG CGCGGTGGCT CACGCCTGTA 1200
ATCCCAGCAC TTTGGGAGGC TGAGGCGGGT GGATCACTTG AGGTCAGGAG TTCCTAACCA 1260
GCCTGGTCAA CATGGTGAAA CCCCCTCTCT ACTAAAAATA CAAAAATTAG CCGGGCATGG 1320
TGGCGCGCAC CTGTAATCCC AGCTACTTGG GAGGCTGAGG CAAGAGAATT GCTTGAACCC 1380
AGGAGATGGA AGTTGCAGTG AGCTGATATC ATGCCCTGT ACTCCAGCCT GGGTGACAGA 1440
GCAAGACTCT GTCTCAAAAA AATAAAAAATA AAAATAAATT TGGTTCTAAT AGAACTCAGT 1500
TTTAACTAGA ATTTATTCAA TTCCTCTGGG AATGTTACAT TGTTTGTCTG TCTTCATAGC 1560
AGATTTTAAT TTTGAATAAA TAAATGTATC TTATTCACAT C 1601

【書類名】 図面

【図1】

図1



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 IL-10蛋白を病因とする疾患に有効なアンチセンスオリゴヌクレオチド、及びそれを有効成分として含有するアトピー性皮膚炎等の疾患の治療薬を提供する。

【解決手段】 一定の配列を有し、IL-10蛋白をコードする染色体DNAおよび／またはmRNAと特異的にハイブリダイズし、IL-10蛋白の発現を阻害することを特徴とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、及びそれを有効成分として含有するアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、SLE、EBウイルス感染症またはリンパ腫用治療薬。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【手数料の表示】

【納付金額】

0円

【特許出願人】

【識別番号】

000160522

【住所又は居所】

佐賀県鳥栖市田代大官町408番地

【氏名又は名称】

久光製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100098110

【住所又は居所】

東京都渋谷区恵比寿4-20-2 恵比寿ガーデン

テラス式番館510 村山・田中国際特許事務所

【氏名又は名称】

村山 みどり

【代理人】

【識別番号】

100090583

【住所又は居所】

東京都渋谷区恵比寿4-20-2 恵比寿ガーデン

テラス式番館510 村山・田中国際特許事務所

【氏名又は名称】

田中 清

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】 000160522

【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地

【氏名又は名称】 久光製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100098110

【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿4-20-2 恵比寿ガーデン
テラス式番館510 村山・田中国際特許事務所

【氏名又は名称】 村山 みどり

【代理人】 申請人

【識別番号】 100090583

【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿4-20-2 恵比寿ガーデン
テラス式番館510 村山・田中国際特許事務所

【氏名又は名称】 田中 清

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000160522]

1. 変更年月日 1990年 9月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地
氏 名 久光製薬株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)